

Prüfbericht

auf akute Bientoxizität nach oraler oder Kontakt-Applikation an der Honigbiene (*Apis mellifera* L.)

BioChem Projekt Nr.:	19 48 BAA 0007
Test Substanz:	LIXUM ^{Pro} (Beutenschutz-Lasur)
Auftraggeber:	FloraPren GmbH Clara-Zetkin-Str. 32 07545 Gera, Deutschland
Prüfeinrichtung:	BioChem agrarr, Labor für biologische und chemische Analytik GmbH, Kupferstr. 6, 04827 Machern OT Gerichshain, Deutschland
Test Spezies:	<i>Apis mellifera</i> L. (<i>iberiensis</i> E.)
Test Art:	Kontakttest nach OECD Richtlinie Nr. 214 Oraler Test nach OECD Richtlinie Nr. 213
Durchführung der Tests:	27. – 29. November 2018 (durch: Agrologia S.L.U., Finca La Dehesilla, Ctra. A-362, Km. 4.7, 41710 Utrera (Sevilla), Spanien)

1 Einleitung

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung einer möglichen Toxizität der **Beutenschutz Lasur LIXUM^{Pro}** auf die Honigbiene *Apis mellifera* L. unter Laborbedingungen. Hierbei wurde die Toxizität nach Kontaktapplikation oder oraler Applikation anhand der Mortalität sowie Verhaltensauffälligkeiten im Vergleich zur Kontrolle bewertet. Die durchgeführte Studie entspricht dem Testdesign der OECD Test-Richtlinien Nr. 213 (oral; 1998) und Nr. 214 (Kontakt; 1998), welche für die Prüfung von Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln herangezogen werden.

2 Material und Methoden

Kontakttest - akute Toxizität

In der Kontakttestung wurden adulte Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) mit 5 Teststraten (jeweils 3 Replikaten) von **LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur** behandelt. Hierfür wurden die Bienen von einer Beute in 10er Gruppen in die Testkäfige (Replikate) überführt. Nach einer kurzen Betäubung mit CO₂ erhielt jede einzelne Biene einen 2 µL Tropfen Testlösung auf den dorsalen Thorax (Abbildung 1). In einer parallel mitgeführten Kontrolle wurde Wasser mit einem bienenuntoxischen Benetzungsmittel (1 % v/v Tween[®]80; zur besseren Haftung des Wassertropfens auf dem behaarten Bienenkörper) behandelt.

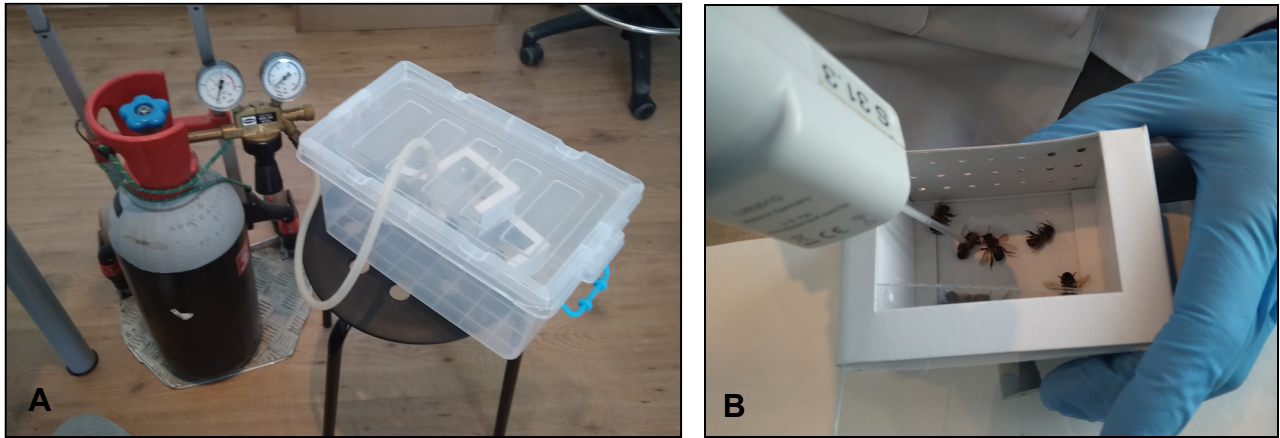


Abbildung 1:

A) Equipment zur Betäubung der Bienen im Kontakttest; B) Kontakt-Applikation der Testlösung auf den Thorax der Biene

Oraler Test - akute Toxizität

In der oralen Testung wurden adulte Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) mit 5 Teststraten (jeweils 3 Replikaten) von LIXUM^{Pro} **Beutenschutz Lasur** behandelt. Hierfür wurden die Bienen von einer Beute in 10er Gruppen in die Testkäfige (Replikate) überführt und erhielten ein Futterröhrchen mit behandelter Zuckerlösung (200 μ L pro Käfig mit 10 Bienen) (Abbildung 2). Aufgrund ihres sozialen Verhaltens erfolgt eine Gruppenfütterung vor dem Hintergrund, dass das Futter gleichmäßig untereinander verteilt bzw. weitergegeben wird, wodurch jede Biene 20 μ L behandelte Zuckerlösung empfängt und somit der gleichen Dosis ausgesetzt ist. Durch Zurückwiegen der Futterröhrchen nach der Darreichung der Applikationslösungen konnte die tatsächlich konsumierte Menge und Dosis pro Biene bestimmt werden, die im weiterführenden Bericht als solche angegeben sind.

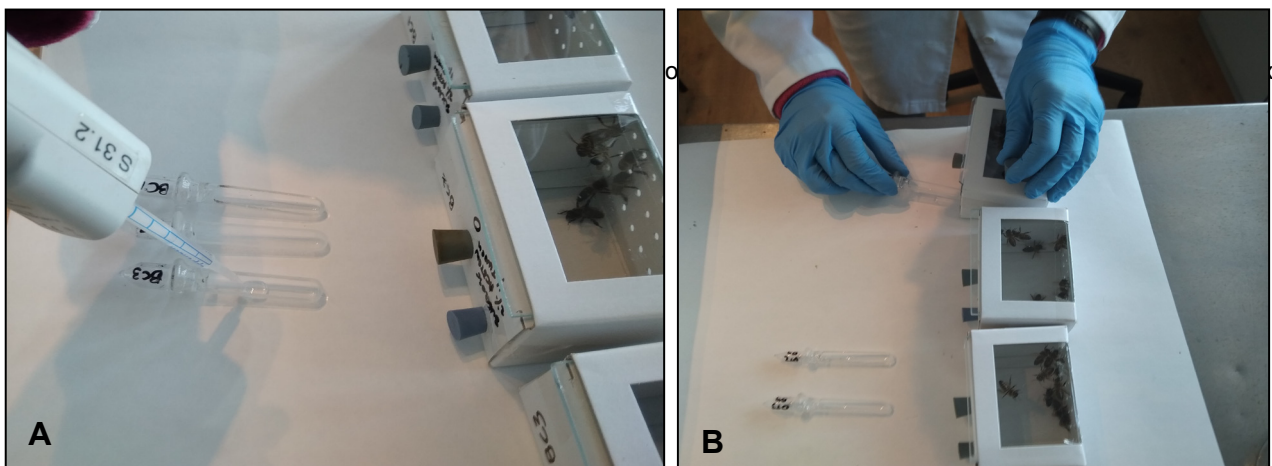
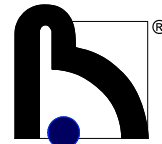


Abbildung 2:

A) Einfüllen der Testlösung in die Futterröhrchen für die Applikation ; B) Bereitstellen der Testlösung für die Bienen (orale Applikation)



Allgemeine Erläuterungen

Für Pflanzenschutzmittel und Chemikalien beginnt das Testprogramm zur Bestimmung der Verträglichkeit gegenüber der Honigbiene mit einer Laborprüfung. Dabei wird die akute Toxizität an der Honigbiene nach oraler Aufnahme oder Kontaktapplikation bestimmt. Hierbei wird, als Maß für die Toxizität, eine letale Dosis (LD₅₀) ermittelt, bei der 50 % der Versuchstiere sterben. Dieser Endpunkt wird mit der in der Praxis vorgesehenen Aufwandmenge in Beziehung gebracht, woraus sich ein Hazard Quotienten (HQ; Schädigungsquotienten) ergibt. Zur Risikoabschätzung dient dieses Verhältnis als Indikator, ob ein Mittel als bienengefährlich oder nicht-bienengefährlich eingestuft werden kann. Ein HQ-Wert von 50 dient als Schwellenwert: liegt der ermittelte Wert unter 50, kann das Mittel als nicht-bienengefährlich eingeschätzt werden, und es bedarf keiner weiteren Testung unter Freiland- oder Halbfreilandbedingungen. Was im Detail bedeutet, dass unannehmbare akute Auswirkungen auf das Überleben und die Entwicklung des Bienenvolkes ausgeschlossen werden können.

Datenerhebung - Testbedingungen

Bei beiden Tests wurden die Mortalität sowie Effekte beim Verhalten erhoben und 4 h, 24 h und 48 h nach der Applikation dokumentiert. Die Bonitur zu den Verhaltensauffälligkeiten erfolgte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle der Tests. Als Endpunkt beider Tests gilt die LD₅₀ (letale Dose bei der 50 % der Tiere tot sind) nach 48 h. Die Mortalität [%] ergibt sich aus der Anzahl lebender Bienen im Verhältnis zu der Anzahl von Bienen zu Testbeginn. Für die Kontrolle gibt es ein Validitätskriterium, dass nach 48 h die Mortalität in der Kontrollgruppe $\leq 10\%$ sein muss.

Beide Tests wurden unter kontrollierten Klimabedingungen mit einem Temperaturbereich von 25 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 50 – 70 % durchgeführt (Abbildung 3). Während des gesamten Versuchs standen die Bienen in kompletter Dunkelheit, außer zu den Boniturzeiten. Direkt im Anschluss an die Applikation (nach Kontaktapplikation bzw. Entnahme der Futterröhrchen mit behandelter Testlösung) wurden die Bienen in den Käfigen mit unbehandelter Zuckerlösung gefüttert, die ihnen unbegrenzt (*ad libitum*) während der gesamten Testzeit zur Verfügung stand.

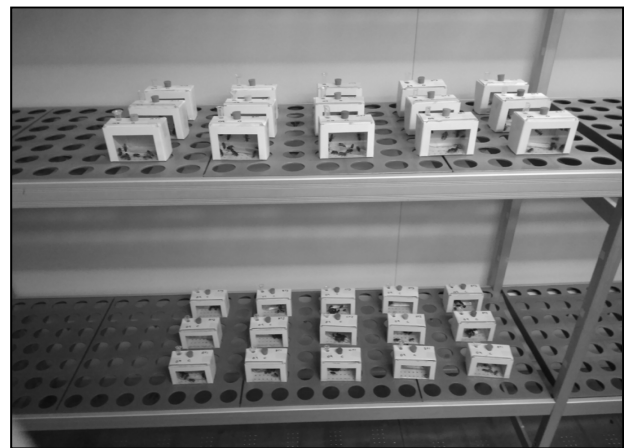
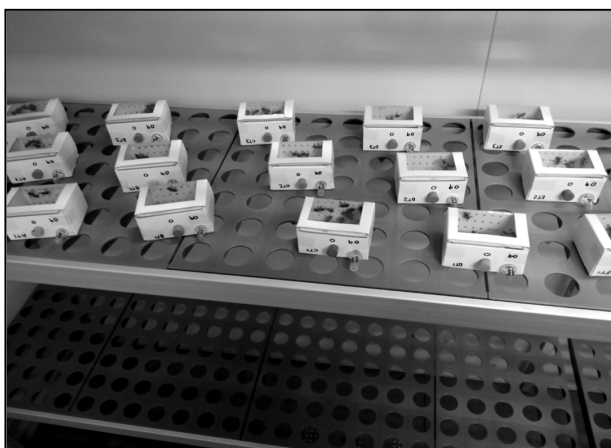
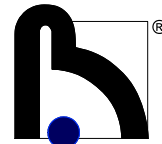


Abbildung 3: A) Applikationsphase im oralen Test; B) Aufstellung der Testkäfige in Testraum



3 Ergebnisse

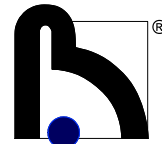
Kontakttest

Im Kontakttest zeigte die Kontrollgruppe keine Mortalität nach 48 h sowie keine Auffälligkeiten im Verhalten nach 4 h, 24 h und 48 h. Die Kontaktapplikation der Teststraten von 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 µg LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur / Biene brachte keine Mortalität nach 48 h hervor. Es zeigten sich während des gesamten Tests keine Abweichungen im Verhalten nach der Behandlung mit ≤ 100.0 µg LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur / Biene. Dementsprechend ist die LD₅₀ (48 h) > 100.0 µg LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur / Biene.

Kontakttest - Mortalität und Verhaltensauffälligkeiten von der Honigbiene

Behandlungs- gruppe	Dosis	4 h Bonitur			24 h Bonitur			48 h Bonitur						
		Mortalität mean %	Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität mean %	Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität mean %	Verhaltens- auffälligkeiten			
			Σ	A	M		Σ	A	M		Σ	A	M	
Kontrolle	Tween solution	0.0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0
LIXUMPro [µg Produkt/ Biene]	100.0	0.0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0
	50.0	0.0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0
	25.0	0.0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0
	12.5	0.0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0
	6.3	0.0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0

Mortalitätswerte basieren auf Mittelwerten von 3 Replikaten mit jeweils 10 Bienen (je Dosis); Verhaltensauffälligkeiten (im Vergleich zur Kontrolle) wurden differenziert in: A) Beeinträchtigung in der Bewegung M) moribund (nahezu tot)



Oraler Test

Im Kontakttest zeigte die Kontrollgruppe keine Mortalität nach 48 h sowie keine Auffälligkeiten im Verhalten nach 4 h, 24 h und 48 h. Die Kontakapplikation der Teststraten von 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 µg LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur / Biene brachte keine Mortalität nach 48 h hervor. Es zeigten sich während des gesamten Tests keine Abweichungen im Verhalten nach der Behandlung mit ≤ 100.0 µg LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur / Biene. Dementsprechend ist die LD₅₀ (48 h) > 100.0 µg LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur / Biene.

Oraler Test - Mortalität und Verhaltensauffälligkeiten von der Honigbiene

Behandlungs- gruppe	Dosis	4 h Bonitur			24 h Bonitur			48 h Bonitur					
		Mortalität mean %	Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität mean %	Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität mean %	Verhaltens- auffälligkeiten		
			Σ	A	M		Σ	A	M		Σ	A	M
Kontrolle	Tween solution	0.0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	
LIXUM^{Pro} [µg Produkt/ Biene]	100.0	0.0	0	0	0	0	0	0	6.7	0	0	0	
	50.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	
	25.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	
	12.5	0.0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	
	6.3	0.0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	

Mortalitätswerte basieren auf Mittelwerten von 3 Replikaten mit jeweils 10 Bienen (je Dosis); Verhaltensauffälligkeiten (im Vergleich zur Kontrolle) wurden differenziert in: A) Beeinträchtigung in der Bewegung M) moribund (kurz vor dem Sterben)

4 Schlussfolgerung

Die akute Toxizität von LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur wurde nach oraler Applikation oder Kontakapplikation über 48 Stunden beobachtet.

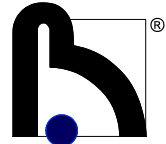
Die LD₅₀ lag in beiden Tests (Kontakt + Oral) über der höchsten Rate von 100.0 µg Produkt/ Biene.

Eine weitere Testung im Halbfreiland oder Freiland sind durch die sehr guten Testergebnisse von LIXUM^{Pro} Beutenschutz Lasur nicht angezeigt.

Weiterhin konnten bis 100.0 µg Produkt / Biene keine Verhaltensauffälligkeiten im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

LIXUM^{PRO} Beutenschutz-Lasur zeigte nach oraler Applikation oder Kontakapplikation keine Effekte auf die Mortalität von Bienen und deren Verhalten im Vergleich zur Kontrolle.

In diesen Tests zeigte LIXUM^{PRO} Beutenschutz-Lasur keine Toxizität gegenüber Bienen.



5 Anhang

Kontakttoxizitätstest – Mortalität und Verhaltensauffälligkeiten

Behandlungsgruppe		4 h Bonitur					24 h Bonitur					48 h Bonitur				
		Mortalität		Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität		Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität		Verhaltens- auffälligkeiten		
Testrate	Replik	No. alive	Mor [%]	Σ	A	M	No. alive	Mor [%]	Σ	A	M	No. alive	Mor [%]	Σ	A	M
Control Sucrose solution	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 100.0 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 50.0 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 25.0 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 12.5 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 6.3 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0

No alive.: Anzahl lebende Bienen

Mor [%]: Mortalität

x: Mittelwert Mortalität [%] / Anzahl Bienen [n]

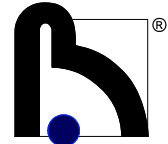
Σ: Summe Anzahl Bienen mit Verhaltensauffälligkeiten

Verhaltensauffälligkeiten wurden differenziert betrachtet:

A: affekted; mit Beeinträchtigungen in der Bewegung

M: moribund; starke Beeinträchtigungen bis nahezu tot

Alle Berechnungen basieren auf der Verwendung von ungerundeten Werten



Oraler Toxizitätstest – Mortalität und Verhaltensauffälligkeiten

Behandlungsgruppe		4 h Bonitur					24 h Bonitur					48 h Bonitur				
		Mortalität		Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität		Verhaltens- auffälligkeiten			Mortalität		Verhaltens- auffälligkeiten		
Testrate	Replik	No. alive	Mor [%]	Σ	A	M	No. alive	Mor [%]	Σ	A	M	No. alive	Mor [%]	Σ	A	M
Control Sucrose solution	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 100.0 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	20	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	28	6.7	0	0	0
LIXUMPro 50.0 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 25.0 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 12.5 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0
LIXUMPro 6.3 µg Produkt/ Biene	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	x	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0	30	0.0	0	0	0

No alive.: Anzahl lebende Bienen

Mor [%]: Mortalität

x: Mittelwert Mortalität [%] / Anzahl Bienen [n]

Σ: Summe Anzahl Bienen mit Verhaltensauffälligkeiten

Verhaltensauffälligkeiten wurden differenziert betrachtet:

A: affekted; mit Beeinträchtigungen in der Bewegung

M: moribund; starke Beeinträchtigungen bis nahezu tot

Alle Berechnungen basieren auf der Verwendung von ungerundeten Werten